

資料

ナフチルエチレンジアミン吸光光度法による 海水試料の全窒素測定法

濱脇 亮次, 小田 新一郎, 後田 俊直

Determination of Total Nitrogen in Sea water samples by Naphthylethylenediamine Absorptiometry

RYOJI HAMAWAKI, SHINICHIROU ODA and TOSHINAO USHIRODA

(Received November 1, 2019)

JIS K 0102 45.2によるアルカリ分解とJIS K 0170-2による銅・カドミウム還元カラム-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせた海水試料中の全窒素分析法について検討した。検討の結果、分解容器及びアルカリ分解条件を最適化することでJIS K 0170-3と同等の精度を得られる分析手法を確立した。また、この分析法は妨害発色を抑制するための中和操作等の必要がない簡便な全窒素分析法であり、海水試料だけでなく、事業場排水等の水試料にも応用できる分析手法と考えられた。

Key words : ナフチルエチレンジアミン吸光光度法, 全窒素分析法, 流れ分析法, 海水試料, アルカリ分解-紫外吸光光度法

緒 言

水中の全窒素（以下「TN」）は、操作性及び精度に優れるアルカリ性ペルオキシニ硫酸カリウム分解・紫外線吸光光度法（日本産業規格（JIS）K 0102 45.2, 以下「UV法」）が工場排水及び環境水（河川水, 海水）等のTN分析法として広く普及している。UV法はアルカリ性ペルオキシニ硫酸カリウム溶液を用いた加熱分解により試料中の窒素化合物を硝酸イオンに分解した後、紫外部（220nm）における吸収強度からTN濃度を測定する方法である [1]。しかし、臭化物イオンやクロムを含む海水試料は、これらのイオンが正の妨害を与えること、これに加えて加熱分解の過程で生成する臭素酸イオンも正の妨害を与えること等から海水試料への適用は困難である。このことから、UV法を応用した海水試料中の全窒素分析 [2] や臭素イオンの影響を除去するための補正式等から海水試料のTNを測定する分析法 [3, 4] が報告されている。

一方で、水試料中の硝酸イオンを測定する方法は、還元蒸留-中和滴定法、イオンクロマトグラフ装置を用いる方法、銅・カドミウム還元カラム-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法（以下「ナフチルエチレンジアミン吸光光度法」）及び流れ分析装置を用いたナフチルエチレンジアミン吸光光度法等がJISに定められている [1]。

その中でも、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法は銅・カドミウムカラムを用いて硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元した後、ナフチルエチレンジアミンと亜硝酸イオンが形成するアゾ化合物を可視領域において測定する方法で、紫外領域に吸収をもつ妨害物質の影響を受けずに硝酸イオンを精度よく測定できるという特徴がある。

さらに、JIS K 0170群に定められた流れ分析法によるナフチルエチレンジアミン吸光光度法 [5] は銅・カドミウムカラムによる還元操作から発色までの工程を自動化した装置を用いるため、簡便でかつ人手による測定誤差が生じにくく、高い精度で硝酸イオンを測定できる。

以上のことから、UV法のアルカリ分解と流れ分析法によるナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせることで、高精度でより簡便な海水試料のTN測定法を構築できると考えられる。本報では、UV法のアルカリ分解とJIS K 0170のナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせた海水試料のTN分析法について検討した。

方 法

1 試薬及び分析機器等

本報で用いた水は全てメルクミリポア(株)製のMillQ水を用いた。水酸化ナトリウム（窒素分析用）、ペルオキシニ硫酸カリウム（窒素分析用）は(株)富士フィル

ム和光純薬製のものをを用いた。イミダゾール、ナフチルエチレンジアミン塩酸塩、スルファニルアミド、TritonX-100はSigma-Aldrich Co. LLC (シグマアルドリッチ) 製のものをを用いた。塩酸 (HCl) 及び硫酸は関東化学(株)製の特級品を用いた。

また、UV法のアルカリ分解時に用いる水酸化ナトリウム-ペルオキシ二硫酸カリウム溶液、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法に用いる発色試薬等はそれぞれの方法 [1, 5] に準じ、調製した。いずれの試薬も使用時に調製した。

海水試料は広島湾の公共用水域常時監視地点のものをを用いた。また、分析に用いた分解容器等はすべて10%塩酸に1昼夜以上浸漬したのち、十分に水で洗浄したものをを用いた。

オートクレーブは(株)トミー精工製LSX-300、UV法のアルカリ分解により得られた分解液に含まれる硝酸イオン濃度は連続流れ分析装置 (オートアナライザーAACS, ビーエルテック(株)製) により測定した。また、JIS K 0170-3に基づくTN分析は連続流れ分析装置 (オートアナライザー-SWAAT, ビーエルテック(株)製) により測定した。なお、この分析装置は保有していないため、ビーエルテック株式会社に海水試料を提供し、測定を依頼した。

2 実験方法

実験はUV法によるアルカリ分解と流れ分析法によるナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせた方法 (以下「AD-CFA法」) により行った (図1)。また、AD-CFA法の確立にあたり、以下の2-1~2-5を検討した。

2-1 分解容器のブランク値の比較

材質、容量及び形状が異なる3つの分解容器

(TNTP測定用100mLPTFE容器 (宮本理研(株), 以下「PTFE100」), 13mLPTFE試験管 (アズワン(株), 以下「PTFE13」), TNTP分解用100mLガラス瓶 (株三商, 以下「Glass100」)) に5, 10, 30, 50mLの水を加え、UV法によるアルカリ分解を行い、得られた液を必要量分取し、HCl (1+60) を用いてpH7.0に調製後、オートアナライザーAACSを用いたナフチルエチレンジアミン吸光光度法により得られた測定値をブランク値 (以下、「BL値」) とした。また、各容器のBL値を測定し、平均値 (A) と標準偏差 (SD) から変動係数 (CV%=SD/A×100) を求め、BL値及びCV%を比較した。なお、オートクレーブには水道水を用いた。

2-2 分解条件がBL値に与える影響

オートクレーブに使用する水がBL値及びTN濃度に与える影響を評価するため、オートクレーブ使用水中の硝酸イオン濃度を0.08 (水道水の約1/5倍) ~2.4mg/L (水道水の約5倍) となるようオートクレーブ使用水に硝酸イオン標準液を添加し、PTFE100及びGlass100の容器に10mL, 30mL, 50mLの水を加えてUV法によるアルカリ分解を行い、2-1と同様の方法にてBL値を測定した。

2-3 試料量とTN濃度の関係

PTFE100及びGlass100に同一の海水試料を10mL, 30mL, 50mL加え、2-2と同一の条件でUV法によるアルカリ分解を行い、得られた液を必要量分取し、2-1と同様の方法にてTN濃度を測定した。

2-4 分解液のpHがTN濃度に与える影響

PTFE100を用いて、50mLの海水試料を加えた後、UV法によるアルカリ分解を行い、得られた分解液の上澄みを必要量分取し、(1+60) HCl又は(1+500) HClを用いてpHを3~13に調整後、2-1と同様の方法にてTN濃度を測定した。

2-5 TN測定手法の比較

本手法の精度を確認するため、AD-CFA法とJIS K 0170-3の自動分析装置によるTN分析法による測定値を比較した。

結果及び考察

1 分解容器のブランク値 (BL値) の比較

一般に、著しく汚染が進んだ海域を除き、海水のTN濃度は0.1~0.7mg/L [6] である。これは、一般的な事業場排水に比べると濃度が低く、BL値が測定値に大きく影響するため、容器のBL値を事前に把握しておく必要がある。UV法では、アルカリ分解に用いる容器は

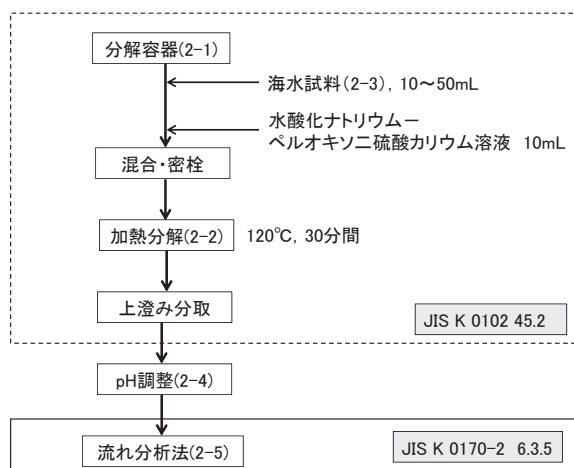


図1 AD-CFA法による海水試料中のTN分析フロー

120℃オートクレーブに耐性のあるPTFE製又はガラス製の分解容器が記載されている [1]. そこで, PTFE製及びガラス製のBL値を測定し, その値を比較した (表1).

その結果, PTFE100の方がGlass100よりもBL値, CV%ともに低い値であった. また, PTFE100, Glass100ともに試料量が少なくなるに従って, BL値は上昇する傾向が見られた. PTFE100の比較対象としてPTFE13を用いたが, PTFE100の方がBL値, CV%ともに低い値であった.

Glass100は全ての条件においてPTFE100よりも高いBL値を示した. これは, アルカリ分解時に容器から溶出したシリカの粒子やガラスに含まれる微量成分等がBL値に影響したと考えられる [7-9]. また, 試料量が少なくなるに従って, BL値は高くなる傾向が見られたが, 分解条件が大きく影響しており, このことは後述する.

PTFE100は分析容器の中で最も低いBL値であったが, アルカリ分解時にBL値に影響を及ぼす成分の溶出が少ないためと考えられる. また, 同じ材質のPTFEでもBL値に若干の違いがみられたが, それは容器の形状が異なっていることや密閉性の違いがBL値に影響したものと推測される.

2 分解条件がBL値に与える影響

UV法におけるアルカリ分解には, 高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ) 装置がよく用いられる. オートクレーブを行う際は水を入れた密閉容器を加熱し, 高温高压の状態で行うが, 処理水には水道水を用いることが多い. 一般に, 水道水は河川水を原水としており, その中には測定対象となる硝酸イオンが含まれている. 実際, 我々が日頃使用している水道水は硝酸イオンが約0.4mg/L程度含まれており [10], 広島湾全域の平均TN濃度である0.28mg/L [6] に比べると高い. 前述のとおり, 海

水のTNは水道水よりも低いため, オートクレーブ使用水がBL値及びTN濃度に影響を及ぼす可能性が考えられる. そこで, オートクレーブ使用水中の硝酸イオン濃度がBL値に与える影響を評価した. 結果を表2に示す.

BL値は前項同様, PTFE100の方がGlass100よりも全ての条件で低かった. PTFE100は, 10mL, 及び30mLにおいてオートクレーブ使用水中の硝酸イオンの影響を受けて上昇する傾向がみられたが, 50mLは同じ値であった. また, Glass100はすべての条件において, 硝酸イオン濃度の上昇に伴うBL値の上昇が確認され, PTFE100以上にその影響を大きく受けていた. この結果から, 硝酸イオン濃度の影響を受けにくいPTFE100が適していると考えられる.

この結果は, 分解時の水蒸気中に含まれる硝酸イオンがBL値に影響を及ぼすことを意味していると考えられる. PTFE100とGlass100どちらもTN測定用の気密性の高い分解容器を用いているが, 分解時の水蒸気の影響を少なからず受けていると考えられる. 従って, 分解処理に用いる水には硝酸イオン濃度が低いものを用いることが重要である. これは, AD-CFA法に限定されるものではなく, 分解工程を要するTN測定法全てに適用されるものと考えられる.

3 試料量とTN濃度の関係

UV法において分析に必要なとされる試料量は50mLと定められているが [1, 11], 我々が取り扱う試料の中には50mLに満たない試料 (10~30mL程度) もある.

そこで, 試料量10, 30, 50mLに対するTN濃度を測定した. 結果は表3に示すが, TN濃度はGlass100が全ての条件において, PTFE100を上回っていた.

PTFE100は表2同様, オートクレーブ使用水中の硝酸イオン濃度の上昇に伴い10mL及び30mLのTN濃度が上昇した. 50mLのTN濃度はオートクレーブ使用水の硝酸イオン濃度に関係なく, 同じ値であった. 一方,

表1 各分解容器のBL値とCV%

	BL 値 (平均値) /CV% (n = 5)			
	5mL	10mL	30mL	50mL
PTFE100	-	0.028/7.5	0.017/4.6	0.012/2.6
PTFE13	0.035/8.2	0.033/7.9	-	-
Glass100	-	0.46/20.1	0.25/30.6	0.054/41.1

表2 オートクレーブ使用水中の硝酸イオン濃度とBL値

オートクレーブ使用水中の硝酸イオン濃度 (mg/L)	BL 値 (平均値, n = 5)								
	0.08			0.4 (水道水)			2.4		
試料量	10mL	30mL	50mL	10mL	30mL	50mL	10mL	30mL	50mL
PTFE100	0.015	0.013	0.009	0.028	0.017	0.012	0.044	0.032	0.013
Glass100	0.41	0.20	0.041	0.46	0.25	0.054	0.53	0.42	0.23

表3 試料量とTN濃度の関係

オートクレープ使用水中の硝酸イオン濃度 (mg/L)	TN濃度 (平均値, n = 3)								
	0.08			0.4 (水道水)			2.4		
試料量	10mL	30mL	50mL	10mL	30mL	50mL	10mL	30mL	50mL
PTFE100	0.14	0.14	0.14	0.18	0.15	0.14	0.25	0.18	0.14
Glass100	0.45	0.30	0.21	0.23	0.15	0.22	0.55	0.35	0.23

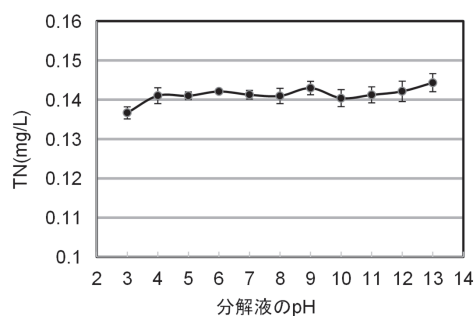


図2 分解液のpHとTN濃度の関係

Glass100は、オートクレープ使用水の硝酸イオン濃度との関係は見られず、値のばらつきが大きかった。

PTFE100で見られたTN濃度の上昇は、オートクレープ使用水中の硝酸イオン濃度の影響を受けたものと考えられる。従って、少量の試料を用いてTNを測定する際は試験環境（分解容器及び分解条件）に注意が必要である。

Glass100のTN濃度にばらつきが見られる理由としては、前述した分解時における容器由来の溶出成分が影響していると推測される。

なお、Glass100はPTFE100よりもBL値が高く、TN濃度のばらつきも大きいことからAD-CFA法には適さないと考え、これ以降の検討は行わなかった。また、Glass100について、BL値が高いことやTN濃度のばらつきが大きいことについては、現在検討を進めており、別の機会において報告する。

4 分解液のpHがTN濃度に与える影響

JIS K 0102やJIS K 0170等に記載されるナフチルエチレンジアミン吸光光度法は塩酸等の酸性条件下において、亜硝酸とナフチルエチレンジアミンがカップリング反応を起こして得られる赤紫のアゾ色素を可視領域（540nm付近）において測定する。しかし、UV法のアルカリ分解で得られた分解液は強アルカリ性であるため、pHが発色に影響を及ぼす可能性がある [11]。そこで、アルカリ分解により得られた分解液のpHがTN濃度に与える影響を評価した。

結果を図2に示すが、ほぼすべてのpHで同じ値であった。また、分解液のpHはpH13付近であるが、pH調整を行わずにそのまま流れ分析法による測定を行った場合で

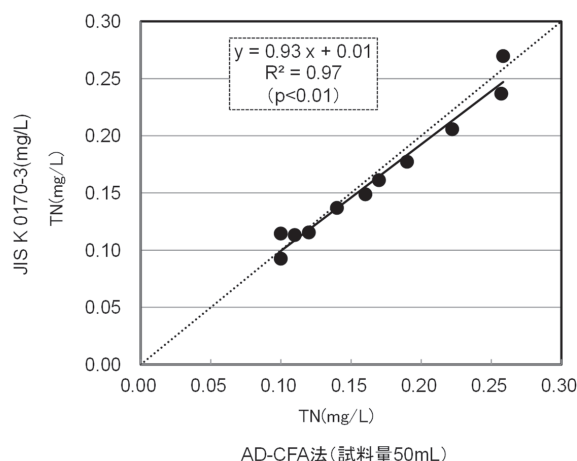


図3 AD-CFA法とJIS K 0170-3のTN濃度の関係性

も誤発色が起こることはなく、測定可能であった。

これは、JIS K 0170-2に用いるイミダゾール系緩衝液がpHによる妨害発色を抑制したと考えられる。このことから、AD-CFA法において、分解液のpH調整は不要と考えられる。また、このイミダゾール緩衝液は、UV法に定められたアルカリ濃度（1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液に相当）にも緩衝作用を示すことから、海水試料だけでなく、塩分を含まない事業場排水等にも適用可能と考えられる。

5 TN測定手法の比較

TN分析法には、UV法に代表されるJIS K 0102 45群の他にもJIS K 0170-3による測定法がある。この方法は試料採取から分解・測定に至るまでの一連の作業が自動化された分析法である [12]。TNの検出原理はUV法のアルカリ分解とJIS K 0170-2によるナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせたものであり、AD-CFA法で行う一連の操作を分析装置化したものである。AD-CFA法の精度を確認するため、JIS K 0170-3との測定値を比較した。結果を図3に示すが、ほぼすべての試料が同じ値を示し、かつ1 : 1の直線上にあった。このことから、AD-CFA法はJIS K 0170-3と同等の精度を有する方法と考えられる。

JIS K 0170-3の特徴はTN測定を全自動で行える点であるが、動植物プランクトンや土砂等のサイズが大きく、沈降しやすいSS成分を含む試料を測定する際はそれが

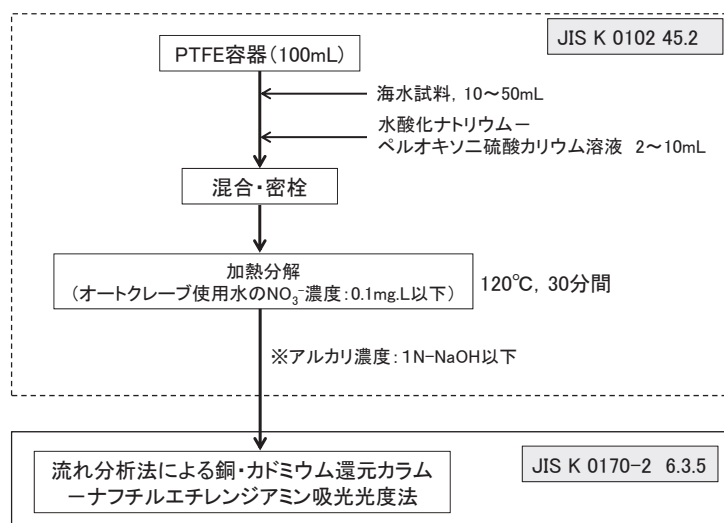


図4 AD-CFA法による海水試料中のTN分析フロー

誤差となる可能性がある。これに対し、AD-CFA法はアルカリ分解までは人手で行わなければならないが、試料中のSS成分を確実にサンプリングできるため、SS成分由来の測定誤差を最小限に抑えることが可能と考えられる。

ま と め

本報では、JIS K 0102 45.2によるアルカリ分解とJIS K 0170-2の流れ分析法装置を用いた銅・カドミウム還元ーナフチルエチレンジアミン吸光光度法を組み合わせた海水中のTN分析法（AD-CFA法）を確立した（図4）。以下に得られた知見を示す。

- 1) 海水試料のTN濃度は低いため、BL値が低い容器を用いる必要がある。特に、AD-CFA法においてはPTFE製の容器が最も適している。
- 2) アルカリ分解条件がTN濃度及びBL値に影響するため、オートクレーブ使用水の硝酸イオン濃度は0.1mg/L以下とすることが望ましい。
- 3) アルカリ分解後の分解液は強アルカリ性であるが、発色操作時に緩衝液を用いるため、妨害発色を抑制するためのpH調整等の操作は不要である。
- 4) AD-CFA法はJIS K 0170-3と同等の精度を有する分析法である。また、動植物プランクトン等のSS成分を多く含む試料を測定する際はAD-CFA法の方が精度よくTNを測定できる手法と考えられる。

謝 辞

JIS K 0170-3によるTN分析について、BLTEC株式会社八巻様に多大なる御協力をいただいた。ここに謝意を

表す。

文 献

- [1] JIS K 0102. 工場排水試験法 (2016). (一財) 日本規格協会
- [2] 井澤博文. 紫外吸光光度法による全窒素分析法の海水試料への適用. 全国環境研会誌, 1995, Vol. 20, p. 149-153
- [3] 中村栄子, 並木 博. 水中の全窒素の紫外吸光定量における臭化物イオンの妨害補正. 工業排水, 1987, 341, p. 12-16
- [4] 日色和夫, 川原昭宜, 田中 孝, 脇田慎一, 山根昌隆, 東 国茂. 紫外吸光光度法による海水中の全窒素の測定法. 水質汚濁研究, 1988, Vol. 11 (5), p. 320-324
- [5] JIS K 0170-2, 流れ分析法による水質試験方法—第2部: 亜硝酸体窒素及び硝酸体窒素 (2011)
- [6] 広島県. ecoひろしま. 平成30年度広島県公共用水域水質測定結果. <https://www.pref.hiroshima.lg.jp/uploaded/attachment/359798.pdf> (参照 2019-10-29)
- [7] 中村栄子, 並木 博. 銅ーカドミウム法による水中の全窒素定量におけるカラムの目詰まり. 分析化学, 1987, Vol. 36 (2), T5-T8
- [8] 「ぶんせき」編集委員会. ミニファイルー実験器具に用いられる素材の特徴ー. 分析化学, 2011 (1), p. 32-33
- [9] 柳沢文孝. ガラスと水の反応について. 鉱山地質, 1990, Vol. 40 (5), p. 353-362
- [10] 広島市水道局. 平成29年度水質検査年報. <http://>

- water.city.hiroshima.jp/quality/snenpou/pdf/
suishitunenpoh29.pdf (2019-10-29)
- [11] 並木 博ほか. 詳解「工場排水試験方法」(改訂5
版). 日本規格協会. P. 345-357
- [12] JIS K 0170-3, 流れ分析法による水質試験方法—
第3部:全窒素(2011). (一財)日本規格協会